

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-236484

(43)Date of publication of application : 12.09.1995

---

(51)Int.Cl. C12N 9/96  
C12N 9/52  
// A23C 19/032  
C12N 1/20  
(C12N 9/52  
C12R 1:225 )  
(C12N 9/52  
C12R 1:23 )  
(C12N 9/52  
C12R 1:245 )  
(C12N 9/52  
C12R 1:46 )

---

(21)Application number : 06-058084

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 02.03.1994

(72)Inventor : SHIMAMURA SEIICHI  
ISHIBASHI NORIO  
MIYAGAWA HIROSHI  
YASUMI KATSUE

---

(54) ENZYMATIC PREPARATION

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an enzymatic preparation having peptidase activity and specifically eliminated acid-forming capability and an enzymatic preparation capable of imparting a fermented dairy product with excellent taste and flavor by the decomposition of protein without applying acid taste to the product.

CONSTITUTION: This enzymatic preparation having peptidase activity and specifically eliminated acid-forming capability is produced by treating cells of lactic bacteria selected from *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus easei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* or mixed cells of two or more kinds of the above strains under a pressure of  $\geq 150$ MPa.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-236484

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

|                          |        |           |     |        |
|--------------------------|--------|-----------|-----|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号   | 庁内整理番号    | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N                  | 9/96   |           |     |        |
|                          | 9/52   |           |     |        |
| // A 2 3 C               | 19/032 |           |     |        |
| C 1 2 N                  | 1/20   | C 8828-4B |     |        |
| (C 1 2 N                 | 9/52   |           |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

|          |                |         |   |
|----------|----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平6-58084     | (71)出願人 | 000006127<br>森永乳業株式会社<br>東京都港区芝5丁目33番1号       |
| (22)出願日  | 平成6年(1994)3月2日 | (72)発明者 | 島村 誠一<br>神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業<br>株式会社栄養科学研究所内 |
|          |                | (72)発明者 | 石橋 憲雄<br>神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業<br>株式会社栄養科学研究所内 |
|          |                | (72)発明者 | 宮川 博<br>神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業<br>株式会社栄養科学研究所内  |
|          |                | (74)代理人 | 工藤 力<br>最終頁に続く                                |

(54)【発明の名称】 酵素調製物

(57)【要約】

【目的】 酸生成能が特異的に消失し、かつペプチダーゼ活性を有する酵素調製物を提供すること及び特に発酵乳製品に酸味を付与せず、かつタンパク質の分解による優れた風味を付与し得る酵素調製物を提供する。

【構成】 ラクトバシラス・ヘルベティカス、ラクトバシラス・ブルガリカス、ラクトバシラス・ラクティス、ラクトバシラス・カゼイ、ラクトバシラス・アシドフィラス、ラクトバシラス・ガッセリ、ストレプトコッカス・サーモフィラス、ストレプトコッカス・クレモリス及びストレプトコッカス・ラクティスからなる群より選択される乳酸菌の菌体又はこれらの2種以上を混合した乳酸菌の混合菌体の少なくとも150MPaの加圧処理物からなり、ペプチダーゼ活性を有し、かつ特異的に酸生成能を消失している酵素調製物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトバシラス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバシラス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバシラス・ラクティス(*Lactobacillus lactis*)、ラクトバシラス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・ガッセリ(*Lactobacillus gasserii*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス・クレモリス(*Streptococcus cremoris*)及びストレプトコッカス・ラクティス(*Streptococcus lactis*)からなる群より選択される乳酸菌の菌体又はこれらの2種以上を混合した乳酸菌の混合菌体の少なくとも150MPaの加圧処理物からなり、ペプチダーゼ活性を有し、かつ特異的に酸生成能を消失している酵素調製物。

【請求項2】 アミノペプチダーゼ活性が、酵素調製物乾燥重量1g当たり少なくとも10単位である請求項1記載の酵素調製物。

【請求項3】 加圧処理圧が、200～500MPaである請求項1又は請求項2記載の酵素調製物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酵素調製物に関する。詳しくは、本発明は、発酵乳製品の製造に使用し得るラクトバシラス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*:以下Lhと記載することがある)、ラクトバシラス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*:以下Lbと記載することがある)、ラクトバシラス・ラクティス(*Lactobacillus lactis*:以下Llと記載することがある)、ラクトバシラス・カゼイ(*Lactobacillus casei*:以下Lcと記載することがある)、ラクトバシラス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*:以下Laと記載することがある)、ラクトバシラス・ガッセリ(*Lactobacillus gasserii*:以下Lgと記載することがある)、ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*:以下Stと記載することがある)、ストレプトコッカス・クレモリス(*Streptococcus cremoris*:以下Scと記載することがある)及びストレプトコッカス・ラクティス(*Streptococcus lactis*:以下Slと記載することがある)からなる群より選択される乳酸菌の菌体又はこれらの2種以上を混合した乳酸菌の混合菌体の加圧処理物からなり、ペプチダーゼ活性を有し、かつ酸生成能のない酵素調製物に関する。

【0002】本明細書において、百分率の表示は、酵素活性の相対値を除き、特に断りのない限り重量による値である。

## 【0003】

【従来の技術】古来から、乳酸菌の酸生成能及び蛋白分解活性を利用して、獣乳から発酵乳(ヨーグルト)又は

チーズが製造されてきた。特にチーズの製造においては、熟成中にスターターとして添加した乳酸菌由来の蛋白分解酵素及び獣乳を凝固させるために添加したレンネット(凝乳酵素)が、獣乳中の蛋白質に作用して独特の風味を形成し、チーズの嗜好性を高める重要な役割を果たしてきた。

【0004】一方、チーズの熟成には通常3～6か月を要するため、熟成期間の短縮を目的として、高い蛋白分解活性を有する乳酸菌スターターを使用したり、チーズ中でのスターター乳酸菌数を高める方法が知られている[ネザーランド・ミルク・アンド・デイリー・ジャーナル(*Netherlands Milk and Dairy Journal*)、第15巻、第151～164ページ、1961年。以下従来技術1と記載することがある]。

【0005】また、スターター乳酸菌と共にLcの培養細胞あるいはLc、Lh、Lb、Llの無細胞抽出液を利用する方法[ミルヒビッセンシャフト(*Milchwissenschaft*)、第36巻、140～142ページ、1981年。ミルヒビッセンシャフト(*Milchwissenschaft*)、第37巻、325～326ページ、1987年。以下従来技術2と記載することがある]、Scのリゾチー処理細胞を使用する方法[ジャーナル・オブ・デイリー・リサーチ(*Journal of Dairy Research*)、第43巻、第301～311ページ、1976年。以下従来技術3と記載することがある]、乳糖利用能を欠損したSl細胞を使用する方法[オーストラリアン・ジャーナル・オブ・デイリー・テクノロジー(*The Australian Journal of Dairy Technology*)、第38巻、第49～54ページ、1983年。以下従来技術4と記載することがある]、加熱処理した混合乳酸菌スターター、Lh、Lb、Ltを使用する方法[ジャーナル・オブ・デイリー・リサーチ(*Journal of Dairy Research*)、第42巻、第313～326ページ、1975年。ミルヒビッセンシャフト(*Milchwissenschaft*)、第42巻、第83～88ページ、1987年。以下従来技術5と記載することがある]、凍結融解処理して使用する方法[ミルヒビッセンシャフト(*Milchwissenschaft*)、第42巻、第139～144ページ、1987年。以下従来技術6と記載することがある]も知られている。

【0006】一方、最近になって、食品加工に加圧を利用しようとする試みが盛んになり、特に食品の風味、物性、食品微生物に対する殺菌効果に及ぼす影響を明らかにする種々の報告がなされており、乳酸菌に関連してもラクトバシラス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)に対する殺菌効果(防菌防黴、第18巻、第129ページ、1990年)、乳酸菌及び/又は酵母によって発酵した発酵乳を加圧処理し、後酸度上昇を抑制する方法(日本食品工学会誌、第39巻、第2号、第173～177ページ、1992年及び特開平4-75555号公報。以下従来技術7と記載することがある)等を例示することが

できる。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記従来技術 1 の方法では、乳酸菌が有する蛋白分解力により熟成は促進されるが、同時に乳酸菌が有する強力な酸生成能のために、熟成中に過剰な酸の生成を惹起し、チーズの pH を低下させ、品質を劣化させる原因となっていた。

【0008】この不都合を解決するために、前記従来技術 2～6 の方法が採用されたが、これらの方法は、①酸生成能の失活が十分でないこと、②熟成の促進に必要な蛋白分解活性も同時に低下すること、③処理操作が複雑であること、及び④苦味の生成が強いこと等の問題があった。

【0009】更に、従来技術 7 のようにヨーグルト等の乳製品の品質保持のために、加圧処理を行った例はあるが、酵素調製物の特定の機能を消滅させ、その他の機能を維持した酵素調製物の製造を目的として加圧処理を使用した例はない。

【0010】本発明者らは、前記従来技術に鑑みて、酸生成能が消失し、かつペプチダーゼ活性を有する酵素調製物について鋭意研究を行った結果、乳酸菌体の加圧処理物が著効を有することを見出し、本発明を完成した。

【0011】本発明の目的は、酸生成能が特異的に消失し、かつペプチダーゼ活性を有する酵素調製物を提供することである。

【0012】本発明の他の目的は、特に発酵乳製品に酸味を付与せず、かつタンパク質の分解による優れた風味を付与し得る酵素調製物を提供することである。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決する本発明は、ラクトバシラス・ヘルペティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバシラス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバシラス・ラクティス (*Lactobacillus lactis*)、ラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・ガッセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*) 及びストレプトコッカス・ラクティス (*Streptococcus lactis*) からなる群より選択される乳酸菌の菌体又はこれらの 2 種以上を混合した乳酸菌の混合菌体の少なくとも 150 MPa の加圧処理物からなり、ペプチダーゼ活性を有し、かつ特異的に酸生成能を消失している酵素調製物であり、アミノペプチダーゼ活性が、酵素調製物乾燥重量 1 g 当たり少なくとも 10 単位であること及び加圧処理圧が、200～500 MPa であることを望ましい態様としてもいる。

【0014】次に本発明について詳述する。

【0015】本発明の酵素調製物は、乳酸菌を培養し、菌体を含む培地そのもの又は培地から菌体を集め、加圧処理して製造される。本発明の酵素調製物に使用する乳酸菌には特に制限は無く、容易に入手し得る乳酸菌であれば如何なる種であってもよい。

【0016】乳酸菌の培養は、公知の方法で体行うことができ、乳酸菌が良好に生育する方法であれば特に制限はない。即ち、乳酸菌の培養に用いる培地としては、乳酸菌が良好に生育できる公知の液体培地を使用することができ、炭素源としてグルコース、乳糖、ショ糖等、窒素源として酵母エキス、肉エキス、ペプトン等、塩類としてリン酸一カリウム、リン酸二カリウム、酢酸ナトリウム等からなる液体培地、脱脂乳、還元脱脂乳、これらに上記の窒素源を加えた乳培地等を例示することができる。

【0017】培養温度は乳酸菌の増殖適温付近の 25～40℃、培養時間は 5～24 時間で適宜培養することができる。培養中に生成する乳酸を中和し、菌の生育を高めるために、カセイソーダ溶液、アンモニア溶液、炭酸ナトリウム溶液等のアルカリ剤を添加しながら攪拌培養を行うこともできる。

【0018】前記回分培養の他に、菌体をさらに効率よく培養するために、流加培養、連続培養、透析培養等により乳酸菌を培養することもできる。

【0019】培養終了後、遠心分離機又は膜分離機等により菌体を集菌し、洗浄し、濃縮し、のち乳成分を含まない液体に菌体を懸濁し、加圧処理を行う。加圧は、静水圧により少なくとも 150 MPa、望ましくは 200 MPa から 500 MPa の範囲で行うことができる。通常、加圧温度は 20～45℃、加圧時間は 1～30 分間程度であるが、加圧温度を高くして加圧時間は短くすることも又加圧温度を低くして加圧時間は長くすることも可能であり、温度及び時間を適宜変更することができる。しかしながら、最も望ましくは加圧温度 37℃、加圧時間は 10 分間程度である。

【0020】加圧処理後の菌体懸濁液は、そのまま液状の形で酵素調製物として使用することもでき、低温で濃縮して濃縮酵素調製物とすることもでき、長期保存のためにこれら液状の酵素調製物を凍結することもでき、噴霧乾燥又は凍結乾燥により粉末状の酵素調製物とすることもできる。更に、酵素力価を調整するために脱脂粉乳、乳糖等の賦形剤を用いて希釈又は倍散し、酵素調製物とすることもできる。

【0021】通常、本発明の酵素調製物を蛋白質の分解に使用する場合、AP 活性が少なくとも 10 単位あれば、十分その目的を達成することができるので、使用目的に応じて適宜の活性単位に調製することができる。

【0022】次に試験例を示して本発明を詳述する。

#### 【0023】試験例 1

この試験は、加圧圧力が酵素活性に与える効果を調べる

ために行った。

#### 【0024】1) 試料の調製

Lh 1AM-1042株を115℃で15分間滅菌した活性化牛乳培地(10%還元脱脂乳に酵母エキスを0.2%添加した牛乳培地)500mlに3%の割合で接種し、37℃で16時間静置培養した。この培養液に2%クエン酸ソーダ溶液500mlを加え、20%カセイソーダ溶液でpHを7.0に調整した後、遠心分離して菌体を集め、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2回洗浄し、2%(w/v)の菌体懸濁液約50mlを調製した。菌体懸濁液20mlを無菌のポリエチレン製袋に充填し、ヒートシーラーで密封し、試験に供した。

#### 【0025】2) 試験方法

前記試料を、予め37℃に保温した高圧処理装置(三菱重工業社製。モデルMFP-7000)内に収納し、静水圧0、100、150、200、250、300、400及び500MPaで10分間加圧し、加圧処理後超音波で菌体を破碎し、次の方法により酵素活性を測定した。

#### 【0026】①アミノペプチダーゼ(以下APと記載することがある)活性

超音波処理後の菌体懸濁液を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、0.2%(w/v)の菌体懸濁液を調製した。一方、合成基質Leu-pNA(コクサン・ケミカル・ワークス社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解し、2mMのLeu-pNA溶液を調製した。

【0027】前記菌体懸濁液1ml及びLeu-pNA溶液1mlを混合し、37℃で5分間反応させ、のち30%酢酸溶液2mlを加えて反応を停止させ、遊離したp-ニトロアニリドの量を、波長410nmの吸光値から算出した。

#### 【0028】②X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ(以下PDAと記載することがある)活性

超音波処理後の菌体懸濁液を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、0.2%(w/v)の菌体懸濁液を調製した。一方、合成基質Gly-pNA(ペプチド研究所製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解し、2mMのGly-pNA溶液を調製した。

【0029】前記菌体懸濁液1ml及びGly-pNA溶液1mlを混合し、37℃で5分間反応させ、のち30%酢酸溶液2mlを加えて反応を停止させ、遊離したp-ニトロアニリドの量を、波長410nmの吸光値から算出した。

#### 【0030】③プロリニイミノペプチダーゼ(以下PIPと記載することがある)活性

超音波処理後の菌体懸濁液を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、0.2%(w/v)の菌体懸濁液を調製した。一方、合成基質Pro-pNA(コク

サン・ケミカル・ワークス社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解し、2mMのPro-pNA溶液を調製した。

【0031】前記菌体懸濁液1ml及びPro-pNA溶液1mlを混合し、37℃で5分間反応させ、のち30%酢酸溶液2mlを加えて反応を停止させ、遊離したp-ニトロアニリドの量を、波長410nmの吸光値から算出した。

【0032】前記AP、PDA及びPIPの活性測定においては、37℃で1分間に1μMのp-ニトロアニリドを遊離するのに必要な酵素量を1単位と定義し、本明細書においてこれらの酵素活性の単位は、この定義に従って記載されている。

#### 【0033】④β-ガラクトシダーゼ活性

超音波処理後の菌体懸濁液を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、0.05%(w/v)の菌体懸濁液を調製した。一方、合成基質o-ニトロフェニル-p-ガラクトピラノシド(ペーリンガー・マンハイム社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解し、4mMのo-ニトロフェニル-p-ガラクトピラノシド溶液を調製した。

【0034】前記菌体懸濁液2ml及びo-ニトロフェニル-p-ガラクトピラノシド溶液1mlを混合し、37℃で15分間反応させ、のち6.25mMNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液2mlを加えて反応を停止させ、遊離したo-ニトロフェノールの量を、波長420nmの吸光値から算出した。

【0035】β-ガラクトシダーゼ活性は、37℃で1分間に1μMのo-ニトロフェノールを遊離するのに必要な酵素量を1単位と定義し、本明細書においてβ-ガラクトシダーゼ活性の単位は、この定義に従って記載されている。

#### 【0036】⑤乳酸生成系活性

超音波処理後の菌体懸濁液5ml及び1.1%グルコース溶液45mlを混合し、37℃で1時間反応させ、反応液を0.1NNaOH溶液で滴定して酸生成量を乳酸に換算して算出した。

【0037】乳酸生成系の活性は、37℃で1時間の反応で酵素調製物乾燥重量1g当たり生成した乳酸の質量で表示した。

#### 【0038】3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。尚、酵素活性は、無処理の場合の各活性(酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能120mg、β-ガラクトシダーゼ活性170単位、AP76単位、PDA70単位及びPIP10単位)をそれぞれ100とした時の相対値(%)で表示した。

【0039】表1から明らかなように、酸生成能は、150MPa以上の加圧処理によって徐々に減少し(150MPaで45%、200MPaで9%)、250MPa

aで完全に消失した。

【0040】一方、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、AP及びPDAの活性は400MPaまでの加圧処理では全く低下せず、500MPaで若干低下する傾向が認められ、それぞれ92、91及び96%であった。又、PIPの活性は、300MPaまでの加圧処理では全く低下せず、400MPaで94%、500MPaで81%の値を示した。従って、加圧条件は、少なくとも150MPa、望ましくは200~500MPaであることが判明した。

【0041】この結果から、本発明の酵素調製物においては、主たる蛋白分解酵素であるAPの活性が低下しないばかりではなく、それ以外の蛋白分解酵素であるPDA及びPIPの活性も低下していないことが確認され \*

\*た。又、本発明の酵素調製物においては、酸生成能は確実に消失するが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのような酵素の活性は、消失しないことも判明し、本発明の酵素調製物は、所望の酸生成能のみを確実に消失していることが立証された。

【0042】尚、ATCCから入手したATCC8018、常法（小崎道雄監修、「乳酸菌マニュアル」、第6~20ページ、朝倉書店、1992年）により生乳から分離したR-1及び市販チーズから分離したC-1の合計3株のLhについて同一の試験を行ったが、前記と同様な結果が得られた。

【0043】

【表1】

| 測定した活性            | 加 圧 圧 力 (MPa) |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 0             | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 400 | 500 |
| 酸生成能              | 100           | 100 | 45  | 9   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| $\beta$ -ガラクトシダーゼ | 100           | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 92  |
| AP                | 100           | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 91  |
| PDA               | 100           | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96  |
| PIP               | 100           | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 94  | 81  |

(注)

- 1) 数値は酵素活性の相対値(%)を示す。
- 2) 加圧圧力0MPaは、無処理を示す。

#### 試験例2

この試験は、本発明の酵素調製物と加熱処理による方法（従来法）により調製したそれとを比較するために行った。

【0044】加圧処理を、300MPaの圧力、37℃の温度で10分間行ったこと以外は、試験例1と同一の方法により酵素調製物を製造し、試験例1と同一の方法により各酵素活性を測定した。一方、試験例1の方法において2%の菌体懸濁液を調製し、59℃で18秒間及び69℃で18秒間加熱処理を行い、従来法による酵素調製物を製造し、同様に各酵素活性を測定した。

【0045】この試験の結果は、表2に示すとおりである。尚、酵素活性は、試験例1と同様に無処理の場合の各活性（酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能115mg、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性160単位、AP75単位、PDA70単位及びPIP11単位）をそれぞれ100とした時の相対値(%)で表示した。

【0046】表2から明らかなように、59℃で18秒間の加熱処理により製造した酵素調製物では、乳酸生成

系の活性は減少しているが50%が残存し、失活が不十分であり、チーズの熟成に重要な影響を与えるAP及びPIPの活性が、それぞれ60%及び20%に減少し、望ましくはなかった。又、69℃で18秒間の加熱処理により製造した酵素調製物では、乳酸生成能は完全に消失したが、AP及びPIP活性も同時に消失し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ及びPDAの活性もそれぞれ僅かに20%及び30%が残存しているに過ぎなかった。

【0047】これに対して本発明の酵素調製物（加圧処理）では、乳酸生成系の酵素活性が完全に消失し、その他の酵素活性は全く減少しないことが認められた。この結果から、本発明の酵素調製物は、加熱処理して従来法により製造した酵素調製物と比較して、乳酸の生成に関与する酵素系のみが、選択的に失活し、その他の酵素の活性は維持されていることが立証された。尚、他の従来法及び加圧処理条件を変更して製造した酵素調製物についても試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0048】

【表2】

| 測定した活性            | 無処理 | 加圧処理 | 加熱処理   |       |
|-------------------|-----|------|--------|-------|
|                   |     |      | 59℃18秒 | 69℃18 |
| 酸生成能              | 100 | 0    | 50     | 0     |
| $\beta$ -ガラクトシダーゼ | 100 | 100  | 100    | 20    |
| AP                | 100 | 100  | 60     | 0     |
| PDA               | 100 | 100  | 100    | 30    |
| PIP               | 100 | 100  | 20     | 0     |

## (注)

- 1) 数値は酵素活性の相対値(%)を示す。  
2) 加圧処理は、本発明を示す。

## 試験例3

この試験は、Lh以外の乳酸菌の酸生成能及びAP活性を調べるために行った。

【0049】Lhに代えてLb、Ll、Lc、La、Lg、St、Sc及びS1の乳酸菌を用いたこと、Sc及びS1は25℃で培養したこと、酸生成能及びAP活性を測定したこと、並びに300MPaの圧力、37℃の温度で10分間加圧したことを除き、試験例1と同一の方法により、加圧処理して各種乳酸菌から調製した酵素調製物の酸生成能及びAP活性を試験した。

【0050】この試験の結果は、表3に示すとおりである。尚、酵素活性は、試験例1と同様に無処理の場合の各活性(Lbは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能105mg及びAP51単位、Llは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能83mg及びAP48単位、Lcは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能77mg及び\*

\*AP42単位、Laは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能70mg及びAP35単位、Lgは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能89mg及びAP40単位、Stは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能42mg及びAP60単位、Scは酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能30mg及びAP47単位、S1は酵素調製物乾燥重量1g当たり酸生成能33mg及びAP34単位)をそれぞれ100とした時の相対値(%)で表示した。

【0051】表3から明らかなように、試験した各乳酸菌から調製した酵素調製物は、前記試験例1と同様に酸生成能を消失し、かつAP活性を維持していた。この結果から、本発明の酵素調製物は、各種乳酸菌を原料として調製し得ることが確認された。

## 【0052】

## 【表3】

| 菌                          | 種          | 酸生成能 | A P |
|----------------------------|------------|------|-----|
| Lactobacillus bulgaricus   | ATCC-11842 | 0    | 100 |
| Lactobacillus lactis       | ATCC-8000  | 0    | 100 |
| Lactobacillus casei        | ATCC-393   | 0    | 100 |
| Lactobacillus acidophilus  | ATCC-4356  | 0    | 100 |
| Lactobacillus gasseri      | ATCC-33323 | 0    | 100 |
| Streptococcus thermophilus | ATCC-19258 | 0    | 100 |
| Streptococcus cremoris     | ATCC-9625  | 0    | 100 |
| Streptococcus lactis       | ATCC-19435 | 0    | 100 |

## (注)

- 1) 数値は酵素活性の相対値(%)を示す。

## 参考例1

牛の生乳50kgを60℃で10分間殺菌した後、30℃に冷却した。この殺菌牛乳に市販のチーズスターターCH-01(ハンセン社製)を用いて調製したバルクスターター1kgに実施例1で得た酵素調製物100gを添加してよく混合し、30℃で2時間発酵させた。次いで子牛レンネット(ハンセン社製)を0.03%添加して30分間保持してカードを生成させた。このカードを約10mm角となるように切断し、38℃に加温しながら穏やかに1時間攪拌した。カードから分離したホエー

を除去するためにカードを圧搾し、約400gのブロック10ヶを製造した。これを20%の食塩水に10℃で15時間浸漬した後、表面を乾燥させ、ポリエチレン袋に充填して真空包装した。15℃の恒温室で2か月間熟成させたところ、過度な酸生成は認められず、風味、組織共に良好なチーズが得られた。

## 【0053】参考例2

実施例1で得た酵素調製物100gを、実施例6で得た酵素調製物20gに変えたこと、及び15℃の恒温室で1ヶ月間熟成させたこと以外は、参考例1と同一の方法

によりチーズを製造した。チーズの風味と組織は良好で、過度な酸生成は認められなかった。

#### 【0054】参考例3

実施例1で得た酵素調製物100gを、実施例9で得た酵素調製物10gに変えたこと、及び15℃の恒温で1.5か月間熟成させたこと以外は、参考例1と同一の方法によりチーズを製造した。チーズの風味と組織は良好で、過度な酸生成は認められなかった。

【0055】次に実施例を示して本発明を更に詳述するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0056】

##### 【実施例】

##### 実施例1

Lh IAM-1042株を90℃で10分間殺菌した活性化牛乳培地501に3%の割合で接種し、37℃で16時間静置培養した。この培養液を501の2%クエン酸ソーダ溶液と混合し、20%のカセイソーダ溶液でpHを7.0に調整した後、培養液を遠心分離して菌体を集め、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2回洗浄した。2% (w/v)の菌体懸濁液約5lを調製し、400MPa、30℃で15分間加圧処理を行い、液状の酵素調製物約1.5lを製造した。

【0057】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり76単位であった。

##### 【0058】実施例2

LhをC-1株に変えたこと及び300MPa、37℃で10分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、常法により凍結乾燥し、粉末状の酵素調製物約12gを得た。

【0059】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり60単位であった。

【0060】この酵素調製物1部(重量)を市販の乳糖(ミライ社製)3部(重量)で倍散し、酵素調製物約45gを製造した。

##### 【0061】実施例3

LhをATCC8018に変えたこと及び200MPa、30℃で30分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、-25℃の冷凍庫で凍結保存した。

【0062】-25℃で6か月間保存した後、この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり45単位であった。

##### 【0063】実施例4

LhをR-1株に変えたこと及び加圧処理を250MPa、45℃で5分間行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により酵素調製物約1.5lを製造した。

【0064】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり53単位であった。

##### 【0065】実施例5

LhをL1に変えたこと及び加圧処理を350MPa、35℃で10分間行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により酵素調製物約1.5lを製造した。

【0066】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり48単位であった。

##### 【0067】実施例6

LhをLbに変えたこと及び350MPa、37℃で10分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、常法により凍結乾燥し、粉末状の酵素調製物約18gを得た。

【0068】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり51単位であった。

【0069】この酵素調製物10gを市販の還元脱脂粉乳(森永乳業社製)20gで倍散し、酵素調製物を製造した。

##### 【0070】実施例7

LhをLcに変えたこと及び350MPa、45℃で5分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、-25℃の冷凍庫で凍結保存した。

【0071】-25℃で6か月間保存した後、この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり42単位であった。

##### 【0072】実施例8

LhをLaに変えたこと及び加圧処理を400MPa、25℃で25分間行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により酵素調製物約1.5lを製造した。

【0073】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり35単位であった。

##### 【0074】実施例9

LhをStに変えたこと及び500MPa、30℃で3分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、常法により凍結乾燥し、粉末状の酵素調製物約19gを得た。



【0075】この酵素調製物の酵素活性を試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり60単位であった。

【0076】この酵素調製物10gを市販のホエイ蛋白（ミライ社製）30gで倍散し、酵素調製物を製造した。

#### 【0077】実施例10

LhをLgに変えたこと及び500MPa、45℃で1分間加圧処理を行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により液状の酵素調製物約1.5lを製造し、-25℃の冷凍庫で凍結保存した。

【0078】-25℃で6か月間保存した後、この酵素調製物の酵素活性を、試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり40単位であった。

#### 【0079】実施例11

LhをScに変えたこと、培養を25℃で行ったこと及び加圧処理を250MPa、20℃で30分間行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により酵素調製物約1.5lを製造した。この酵素調製物の酵素活性を、試\*

\* 験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり47単位であった。

#### 【0080】実施例12

LhをS1に変えたこと、培養を25℃で行ったこと及び加圧処理を250MPa、30℃で20分間行ったこと以外は、実施例1と同一の方法により酵素調製物約1.5lを製造した。この酵素調製物の酵素活性を、試験例1と同一の方法により測定した結果、酸生成能は認められず、AP活性は酵素調製物乾物重量1g当たり34単位であった。

#### 【0081】

【発明の効果】以上詳述したとおり、本発明は、ペプチダーゼ活性を有し、かつ酸生成能のない酵素調製物に係るものであり、本発明によって奏せられる効果は、次のとおりである。

- 1) 本発明の酵素調製物は、ペプチダーゼ活性を有し、かつ酸生成能がないので、発酵乳製品の製造に利用した場合、酸の生成がなく、風味の優れた製品が得られる。
- 2) 本発明の酵素調製物は、簡単な操作により製造することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:225)

(C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:23)

(C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:245)

(C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:46)

(72) 発明者 安實 克恵

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業  
株式会社栄養科学研究所内